

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro

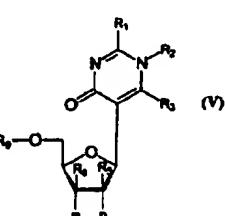
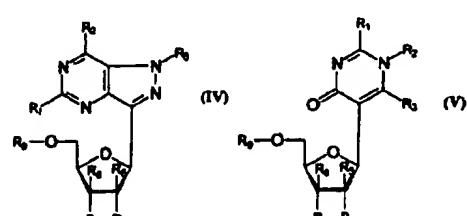
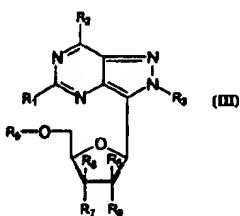
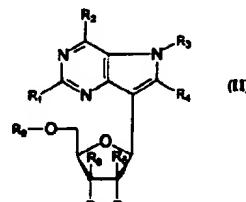
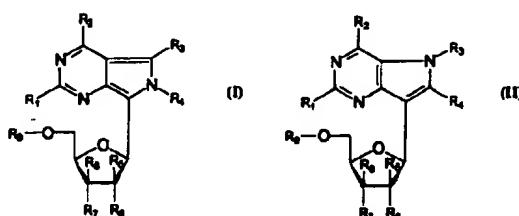


INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<p>(51) Internationale Patentklassifikation<sup>6</sup> : <b>C07H 21/00, C12Q 1/68, C07H 19/04, C07D 405/04, 487/04</b></p>		A1	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 96/28460</b></p> <p>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: <b>19. September 1996 (19.09.96)</b></p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: <b>PCT/EP96/01051</b></p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: <b>12. März 1996 (12.03.96)</b></p> <p>(30) Prioritätsdaten: <b>195 09 038.1 14. März 1995 (14.03.95) DE</b></p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): <b>BOEHRINGER MANNHEIM GMBH [DE/DE]; D-68298 Mannheim (DE).</b></p> <p>(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): <b>MÜHLEGGER, Klaus [DE/DE]; Römerstrasse 7, D-82398 Polling (DE). VON DER ELTZ, Herbert [DE/DE]; In der Au 21, D-82362 Weilheim (DE). SEELA, Frank [DE/DE]; Gutenbergstrasse 44, D-49076 Osnabrück (DE). ROSEMEYER, Helmut [DE/DE]; Lürmannstrasse 39, D-49076 Osnabrück (DE).</b></p> <p>(74) Anwälte: <b>KOLB, Bernd usw.; Boehringer Mannheim GmbH, Patentabteilung, D-68298 Mannheim (DE).</b></p>		<p>(81) Bestimmungsstaaten: <b>CA, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</b></p> <p><b>Veröffentlicht</b> <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i></p>	

(54) Title: **C-NUCLEOSIDE DERIVATIVES AND THEIR USE IN NUCLEIC ACID DETECTION**

(54) Bezeichnung: **C-NUKLEOSID-DERIVATE UND DEREN VERWENDUNG IN DER DETEKTION VON NUKLEINSÄUREN**



(57) Abstract

The invention concerns pyrrolo-[3, 2-d]pyrimidine, pyrazolo-[4, 3-d]pyrimidine and pyrimidine-furanosides, i.e. so-called C-nucleosides of general formulae (I) - (V), and corresponding derivatives and processes for their preparation. The compounds are suitable in particular as RNA and DNA polymerase substrates and can thus be incorporated in RNA and DNA oligonucleotides. Consequently, the compounds are suitable in particular for marking and detecting nucleic acids and for DNA sequencing.

**(57) Zusammenfassung**

Die Erfindung betrifft Pyrrolo-[3,2-d]pyrimidin-, Pyrazolo-[4,3-d]pyrimidin- und Pyrimidin-furanoside, d.h. sogenannte C-Nukleoside der allgemeinen Formeln (I) - (V) bzw. entsprechende Derivate sowie Verfahren zu deren Herstellung. Die Verbindungen sind insbesondere als Substrate für RNA- bzw. DNA-Polymerasen geeignet und somit in RNA- bzw. DNA-Oligonukleotide einbaubar. Demzufolge sind die Verbindungen insbesondere zur Markierung und zum Nachweis von Nukleinsäuren bzw. zur DNA-Sequenzierung geeignet.

**LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AM	Armenien	GB	Vereiniges Königreich	MX	Mexiko
AT	Österreich	GE	Georgien	NE	Niger
AU	Australien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BB	Barbados	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BE	Belgien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BF	Burkina Faso	IE	Irland	PL	Polen
BG	Bulgarien	IT	Italien	PT	Portugal
BJ	Benin	JP	Japan	RO	Rumänien
BR	Brasilien	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
BY	Belarus	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CA	Kanada	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SG	Singapur
CG	Kongo	KZ	Kasachstan	SI	Slowenien
CH	Schweiz	LI	Liechtenstein	SK	Slowakei
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CM	Kamerun	LR	Liberia	SZ	Swasiland
CN	China	LK	Litauen	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
EE	Estland	MG	Madagaskar	UG	Uganda
ES	Spanien	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	MN	Mongolei	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MR	Mauretanien	VN	Vietnam
GA	Gabon	MW	Malawi		

## **C-Nukleosid-Derivate und deren Verwendung in der Detektion von Nukleinsäuren**

Die Erfindung betrifft C-Nukleoside und deren Derivate sowie deren Verwendung zur Markierung, Detektion und Sequenzierung von Nukleinsäuren.

Nukleinsäuren haben als Träger bzw. Überträger der genetischen Information eine zentrale Bedeutung in der belebten Natur. Sie haben deshalb seit ihrer Entdeckung durch F. Miescher das breite Interesse der Naturwissenschaften erregt und zur Aufklärung ihrer Funktion, Struktur und Wirkungsweise geführt. Mit der zunehmenden Kenntnis dieser grundlegenden molekularbiologischen Mechanismen ist es in den letzten Jahren möglich geworden, die Neukombination von Genen zu betreiben. Diese Technologie eröffnet z. B. neue Möglichkeiten in der medizinischen Diagnose und Therapie und in der Pflanzenzüchtung.

Ein wesentliches Werkzeug zur Erklärung dieser Zusammenhänge und der Lösung der Probleme war und ist der Nachweis der Nukleinsäuren und zwar sowohl was ihren spezifischen Nachweis betrifft, als auch was ihre Sequenz, also ihre Primärstruktur angeht.

Die spezifische Nachweisbarkeit von Nukleinsäuren beruht auf der Eigenschaft dieser Moleküle, mit anderen Nukleinsäuren durch Ausbildung von Basenpaarungen über Wasserstoffbrücken in Wechselwirkung zu treten, zu "hybridisieren". In geeigneter Weise markierte, d. h. mit Indikatorgruppen versehene Nukleinsäuren ("Sonden") können so zum Nachweis komplementärer Nukleinsäuren ("target") eingesetzt werden.

Die Ermittlung der Primärstruktur ("Sequenz"), also der Abfolge der heterocyclischen Basen einer Nukleinsäure geschieht mittels den Techniken der "Sequenzierung". Diese Kenntnis der Sequenz ist wiederum die Grundvoraussetzung für einen gezielten und spezifischen Einsatz von Nukleinsäuren in molekularbiologischen Fragestellungen und Arbeitstechniken. Auch die Sequenzierung bedient sich letztlich des Prinzips der spezifischen Hybridisierung von Nukleinsäuren untereinander. Dabei werden wie oben erwähnt ebenfalls markierte Nukleinsäure-Fragmente verwendet.

Demzufolge ist die geeignete Markierung von Nukleinsäuren eine unverzichtbare Voraussetzung jeglicher Nachweismethode.

Schon frühzeitig wurde dafür vor allem die radioaktive Markierung mit geeigneten Isotopen, wie  $^{32}\text{P}$  oder  $^{35}\text{S}$  eingesetzt. Die Nachteile der Verwendung radioaktiver Reagenzien liegen jedoch klar auf der Hand: entsprechende Arbeiten bedürfen spezieller räumlicher Einrichtungen und Genehmigungen, sowie einer kontrollierten und aufwendigen Entsorgung des radioaktiven Abfalls. Die Reagenzien zur radioaktiven Markierung sind zudem kostspielig. Eine längere zeitliche Aufbewahrung derart markierter Proben ist wegen der kurzen Halbwertszeit obiger Nuklide nicht möglich.

Es hat daher in den letzten Jahren nicht an Versuchen gefehlt, diese gravierenden Nachteile zu umgehen, d. h. von einer radioaktiven Markierung wegzukommen. Dabei sollte die hohe Sensitivität dieser Markierungsart möglichst beibehalten werden.

Hier sind in der Tat bereits große Fortschritte erzielt worden [siehe z. B. "Nonradioactive Labeling and Detection of Biomolecules" (Kessler, C., Hrsg.) Springer Verlag Berlin, Heidelberg 1992].

Eine unabdingbare Voraussetzung jeglicher Detektion einer Nukleinsäure ist die vorherige Markierung derselben, und zwar - wie oben ausgeführt - sollte dies möglichst in einer nicht-radioaktiven Art und Weise erreicht werden. Während die radioaktive Markierung der Nukleinsäuren in der Regel durch enzymatisch katalysierten Einbau entsprechender radioaktiver Nukleosid-triphosphate erfolgt, muß eine nicht-radioaktive Markierung über den Einbau einer geeigneten Signal- oder Reportergruppe geschehen.

Als nicht-radioaktive Indikatormoleküle haben sich u. a. hauptsächlich Haptene (wie Biotin oder Digoxigenin), Enzyme (wie alkalische Phosphatase oder Peroxidase) oder Fluoreszenz-farbstoffe (wie Fluorescein oder Rhodamine) bewährt. Diese Signalgruppen können nach verschiedenen Methoden an oder in Nukleinsäuren gebracht werden.

Eine relativ einfache Verfahrensweise z. B. ist die Markierung am 5'-Ende eines mit einer endständigen Aminofunktion versehenen Oligonukleotides mittels aktivierter Indikator-moleküle der oben genannten Art. Sie erlaubt aber nur das Einführen eines oder weniger Indikatormoleküle in ein nur niedermolekulares Oligomer, während eine dichtere Markierung längerkettiger, hochmolekularer Nukleinsäuren mit dem Ziel einer hohen Sensitivität in der Regel über den Einbau von mit Reportergruppen versehenen Nukleosidtriphosphaten mittels Polymerasen im Sinne einer *de novo* -Synthese erfolgen muß.

Entsprechende Verfahren sind dem Fachmann als "nick translation" [Rigby, P. W. et al. (1977) J. Mol. Biol. 113, 237] und "random primed labeling" [Feinberg, A. P. & Vogelstein, B. (1984) Anal. Biochem. 137, 266] bekannt. Eine weitere Methode ist die sogenannte 3'-tailing-Reaktion mit Hilfe des Enzyms "Terminale Transferase".

Die bislang in diesen Verfahren eingesetzten Nukleosid-triphosphate sind nahezu ausschließlich entsprechend modifizierte Derivate der heterocyclischen Basen Adenin, Guanin, Cytosin und Thymin in der Desoxyribonukleotid-, bzw. Adenin, Guanin, Cytosin und Uracil in der Ribonukleotid-Reihe. Solche Derivate sind z. B. von Langer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 6635 (1981); Mühlegger et al., Biol. Chem. Hoppe-Seyler 371, 953 (1990) und in EP 0 063 879 beschrieben. Hier werden die natürlicherweise in DNA und RNA vorkommenden Bausteine in markierter, d. h. mit Signalgruppen versehener Form eingesetzt. Die wesentlichen Nachteile der N-Nukleoside liegen in der Empfindlichkeit der N-glykosidischen Bindung gegenüber sauren pH-Bedingungen und der Abbaubarkeit durch Nukleasen.

Ferner sind einzelne C-Nukleoside (siehe z. B. Suhadolnik, R.J. in "Nucleoside Antibiotics", Wiley-Interscience, New York 1970) und deren Verwendung im therapeutischen (antiviralen oder cancerostatischen) Bereich seit längerem bekannt.

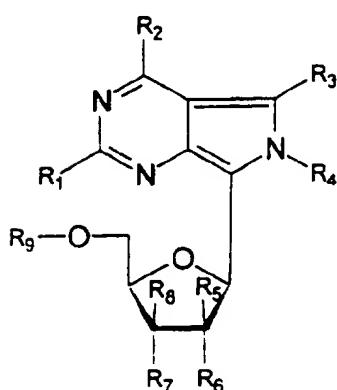
Außerdem sind fluoreszierende C-Nukleosid-Derivate und deren Einbau in DNA- bzw. RNA-Oligonukleotide beschrieben (WO 93/16094). Die sogenannte Eigenfluoreszenz dieser C-Nukleoside ist jedoch bezüglich der Quantenausbeute um ein Vielfaches geringer als die spezieller Fluorophore wie z. B. Fluorescein oder entsprechende Rhodaminederivate. Ein weiterer Nachteil der selbstfluoreszenten C-Nukleoside liegt in ihren vergleichsweise niedrigen Anregungs- und Emissionswellenlängen. Dies hat zur Folge, daß Detektionssysteme, welche auf solchen Derivaten beruhen, nur eine geringe Nachweisempfindlichkeit besitzen. Zum anderen machen sich spektral störende Einflüsse der Meßumgebung (wie biologisches Material, Autofluoreszenz von Gelmatrices etc.) sehr stark bemerkbar.

Die bekannten Nukleoside bzw. Nukleosid-Derivate weisen somit eine Reihe von Nachteilen auf, die sich insbesondere für den Nachweis von Nukleinsäuren negativ auswirken.

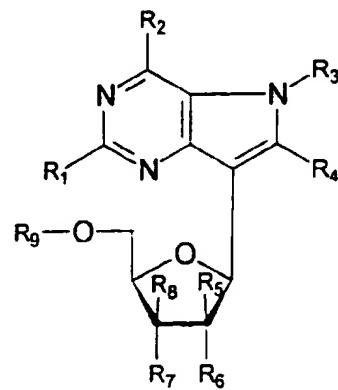
Der Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde mit Signalgruppen modifizierte Nukleosid-Derivate für die Detektion von Nukleinsäuren zur Verfügung zu stellen, die die genannten Nachteile nicht aufweisen, d. h. insbesondere stabiler sowie zugleich enzy-

matisch prozessierbar und für den Nachweis von Nukleinsäuren bei einer praktikablen Wellenlänge geeignet sind.

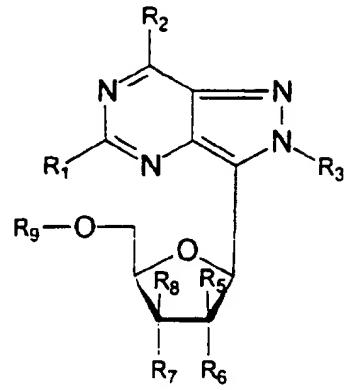
Die Aufgabe wird durch Pyrrolo-[3.2-d]pyrimidin-, Pyrazolo-[4.3-d]pyrimidin- und Pyrimidinfuranoside der allgemeinen Formel I-V gelöst:



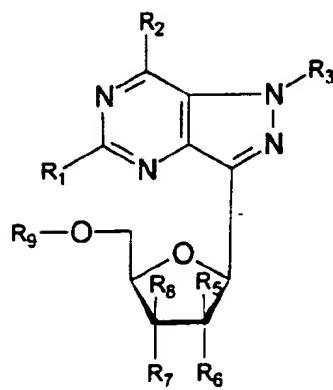
I



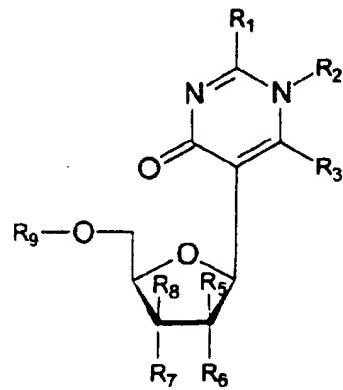
II



III



IV



V

in denen

R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, die gleich oder verschieden sein können. Wasserstoff, Halogen, Hydroxy, Thio- oder substituiertes Thio-, Amino- oder substituiertes Amino-, Carboxy-, Niederalkyl-, Niederalkenyl-, Niederalkinyl-, Aryl-, Niederalkyloxy-, Aryloxy-, Aralkyl-, Aralkyloxy-, oder eine Reportergruppe darstellen.

R<sub>5</sub> und R<sub>6</sub> jeweils Wasserstoff, Hydroxy, Thio- oder substituiertes Thio-, Amino- oder substituiertes Amino-, Niederalkyloxy-, Niederalkenoxy-, Niederalkinoxy-, eine Schutzgruppe oder eine Reportergruppe darstellen.

R<sub>7</sub> Wasserstoff, Hydroxy, Thio- oder substituiertes Thio-, Amino- oder substituiertes Amino-, eine Phosphoramidit- oder H-phosphonat-Funktion, einen in geeigneter Weise spaltbaren Ester- oder Amid-Rest oder eine Reportergruppe darstellt.

R<sub>6</sub> und R<sub>7</sub> zusammen eine weitere Bindung zwischen C-2' und C-3' oder eine Acetal-funktion bilden.

R<sub>8</sub> Wasserstoff oder eine Hydroxy-, Thio- oder substituierte Thio-, Amino- oder substituierte Amino-Gruppe darstellt.

R<sub>9</sub> Wasserstoff, eine Mono-, Di- oder Triphosphatgruppe, oder die alpha-, beta- oder gamma- Thiophosphatanalogen dieser Phosphorsäureester oder eine Schutzgruppe darstellt.

sowie mögliche Tautomere und Salze derselben.

Als Reportergruppe kommen jegliche detektierbaren Gruppen, wie insbesondere Haptene, ein Fluorophor, eine Metall-delatidierende Gruppe, ein Lumiphor, ein Protein- oder ein Interkalator in Frage.

Bevorzugt sind solche Verbindungen der allgemeinen Formel I bis V, in denen die Acetalfunktion der Reste R<sup>6</sup> und R<sup>7</sup> mit einer Reportergruppe substituiert sind.

Des weiteren haben sich solche Verbindungen als besonders geeignet erwiesen, in denen die Reportergruppe über eine sogenannte Linkergruppe an den aglykonischen bzw. Furanosering gebunden ist. Entsprechende Linkergruppen sind dem Fachmann bekannt (siehe z. B. Mühlegger, K. et al. (1990) Biol. Chem. Hoppe-Seyler 371, 953-965 oder Livak, K. J. et al. (1992) Nucl. Acids Res. 20, 4831-4837).

Weiterhin bevorzugt sind Verbindungen der allgemeinen Formel I bis IV, in denen R<sub>1</sub> Wasserstoff, Hydroxy oder eine Aminogruppe, R<sub>2</sub> Hydroxy, eine gegebenenfalls substituierte Aminogruppe oder eine Reportergruppe, R<sub>3</sub> und R<sub>4</sub> Wasserstoff, Halogen oder eine Reportergruppe, R<sub>5</sub> Wasserstoff, R<sub>6</sub> Wasserstoff oder Hydroxy, R<sub>7</sub> Wasserstoff, Hydroxy, Thio, eine gegebenenfalls substituierte Aminogruppe, ein Phosphoramidit oder eine Reportergruppe, R<sub>6</sub> und R<sub>7</sub> zusammen eine Acetalfunktion, R<sub>8</sub> Wasserstoff und R<sub>9</sub> eine Triphosphat-Funktion darstellen.

Bevorzugte Verbindungen der allgemeinen Formel V sind solche, in denen R<sub>1</sub> Hydroxy eine Thio- oder Aminogruppe, die gegebenenfalls substituiert sein können oder eine Reportergruppe, R<sub>2</sub> und R<sub>3</sub> Wasserstoff, Niederalkyl oder eine Reportergruppe, R<sub>5</sub> Wasserstoff, R<sub>6</sub> Wasserstoff oder Hydroxy, R<sub>7</sub> Wasserstoff, Hydroxy, Thio eine gegebenenfalls substituierte Aminogruppe, ein Phosphoramidit oder eine Reportergruppe, R<sub>8</sub> und R<sub>9</sub> zusammen eine Acetalfunktion, R<sub>8</sub> Wasserstoff und R<sub>9</sub> eine Triphosphat-Funktion darstellen.

Die Synthese der neuen, modifizierten C-Nukleoside erfolgt zweckmäßigerweise, indem man von den natürlich vorkommenden Vorstufen ausgeht. So läßt sich beispielsweise Formycin A als Adenosin-Analogon zu Formycin B (einem Inosin-Analogon) desaminnieren. Dieses wiederum kann halogeniert und weiter Nukleophil substituiert werden, wodurch eine Reihe interessanter neuer Verbindungen, wie die der erfindungsgemäßen Art, hergestellt werden können.

Die Synthese der wichtigen 2'-Desoxy-Nukleoside erfolgt durch Deoxigenierung der oben erwähnten natürlich vorkommenden Ribonukleoside wie z. B. Formycin A. Hier wird heute vorwiegend die Deoxigenierungsreaktion nach Barton angewandt (Barton, D. H. R. & Motherwell, W. B. (1981) Pure Appl. Chem. 53, 15).

Des weiteren kann die chemische Synthese der C-nukleoside, wie beispielsweise von K. A. Watanabe in "Chemistry of Nukleosides and Nukleotides" 3, 421-535 (L. B. Townsend, Hrsg.), Plenum Press, New York and London, 1994 eingehend beschrieben, erfolgen.

Die Verwendung der erfindungsgemäßen Verbindungen zur Markierung von Nukleinsäuren mit diversen, definierten Signalgruppen und damit die Detektion und Sequenzierung von Nukleinsäuren hat sich als besonders vorteilhaft erwiesen.

Die erfindungsgemäßen C-Nukleoside der allgemeinen Formeln I bis V besitzen insbesondere gegenüber den klassischen N-glykosidisch verknüpften Nukleosiden und Nukleotiden wie Adenosin, Guanosin, Cytidin, Thymidin, Uridin bzw. deren entsprechenden Phosphorsäureestern eine Reihe von Vorteilen.

Ein Vorteil ist die chemische Stabilität der C-glykosidischen Bindung, z. B. gegenüber sauren pH-Bedingungen. Ein weiterer wesentlicher Vorteil ist die Stabilität dieser Verbindungen gegenüber dem enzymatischen Abbau durch Endo- und Exonukleasen. Diese Enzyme sind in biologischem Material enthalten und können den Nukleinsäure-Nachweis empfindlich stören. Andererseits ist es bekannt, daß DNA- und RNA-Polymerasen

kritisch bezüglich der Akzeptanz mehr oder weniger modifizierter Nukleosid-5'-triphosphate sind, d. h. in der *de novo* Synthese solche Nukleotide als Substrate zu erkennen und einzubauen. Insbesondere das Anknüpfen von Signalgruppen an die Nukleotide beeinflußt erfahrungsgemäß Einbau und Einbaurate.

Daß die erfundungsgemäßen Nukleoside und ihre Derivate in sehr effizienter Weise durch geeignete Polymerasen in Nukleinsäuren eingebaut werden, wie z. B. nach den oben geschilderten Methoden der "nick translation" oder des "random primed labelling", ist nicht ohne weiteres aus dem Stand der Technik zu entnehmen und somit für den Fachmann als überraschend anzusehen.

Der genannten Verfahren bedient man sich ganz allgemein in der Nukleinsäure-Detektion, z. B. beim quantitativen Nachweis nach Blotting-Techniken auf Membranen oder auch in Mikrotiterplatten.

Bei der Sequenzierung, d. h. dem Nachweis der Sequenz einer Nukleinsäure, wird an der zu sequenzierenden Nukleinsäure unter Zuhilfenahme eines kurzen (Start)Oligonukleotides ("primer") und einer Polymerase ein komplementärer Gegenstrang neusynthetisiert.

In der *in situ* -Hybridisierung zur Detektion bestimmter Gene oder Genomabschnitte läuft in der Zelle im Prinzip das gleiche ab, nämlich der spezifische Einbau von markierten Nukleotiden.

Die oben erwähnten Primer, d. h. kurzkettige Oligonukleotide, sollen, um eine optimale Funktion zu gewährleisten, sowohl stabile Basenpaarungen mit dem Matrizenstrang eingehen, als auch durch endogene Nukleasen nicht angegriffen werden.

Dies wird von Oligonukleotiden, welche anstatt der klassischen N-Nukleoside die erfundungsgemäßen C-Nukleoside als Bausteine enthalten, erfüllt.

Gleches gilt für längerbettige Polynukleotide und Nukleinsäuren, die solche C-Nukleosidbausteine beinhalten. Auch diese sind Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

Entsprechende Oligonukleotide, sowie ihre präparativen Vorstufen der Nukleosidphosphoramidite und Nukleosid-H-phosphonate sind daher ebenfalls Gegenstand der Erfindung.

Oligonukleotide werden heute in der Regel nach bekannten Methoden in automatisch arbeitenden DNA/RNA-Synthesegeräten hergestellt.

Solche Syntheseverfahren basieren im wesentlichen auf der schrittweisen Umsetzung der o.a. Phosphoramidite oder H-Phosphonate und damit der fortlaufenden Verknüpfung dieser monomeren Bausteine zu Oligomeren (siehe z.B. T. Brown & D. J. S. Brown in "Oligonukleotides and Analogues-A Practical Approach" (1991) (Eckstein, F., Hrsg.), IRL Press at Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo).

### Legende 5

#### Abbildung 1:

I und II bedeuten pBR 328-DNA, markiert durch DIG-dUTP-Einbau, und III pBR 328-DNA, markiert durch DIG-3-O-succinyl- $\epsilon$ -amino-caproyl-[7-amino-3-(2'-desoxy- $\beta$ -D-erythropento-furanosyl)-1H-pyrazolo-[4,3-d]-pyrimidin-5'-triphosphat-Einbau.

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung näher:

#### Beispiel 1:

##### N1-Carboxymethyl-7-amino-3-( $\beta$ -D-erythro-pentofuranosyl)-1H-pyrazolo-[4,3-d]pyrimidin

70 mg (0,25 mmol) Formycin A, 400 mg (2,2 mmol) Jodessigsäureethylester und 400 mg

(2,88 mmol)  $K_2CO_3$  werden in 5 ml Methanol/Wasser (1:1) 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wird anschließend eingedampft, in ca. 4 ml  $H_2O$  aufgenommen und an einer präparativen HPLC (RP-18, 25 x 1 cm) chromatographiert. Wasser eluiert ( $R_E$  = 7 min.) eine Hauptzone, die gesammelt u. eingeengt wird. Nach Lyophilisation erhält man 48 mg der Titelverbindung (59 %).

$^1H$ -NMR ( $D_2O$ ): 7,98 (s, H-5); 5,02 (d,  $J=7,4$  Hz, H-1'); 4,95 (s,  $CH_2$ ); 4,46 (t,  $J=6,0$  Hz,

H-2'); 4,21 (t,  $J=3,5$  Hz, H-3'); 4,07 (d,  $J=2,7$  Hz, H-4'); 3,70 (m,  $H_2$ -5').

$^{13}C$ -NMR ( $D_2O$ ): 174,4 (C=O); 151,8 (C-7); 151,6 (C-5); 141,4 (C-3); 140,2 (C-3a); 122,9 (C-7a); 86,0 (C-4'); 77,6 (C-1'); 75,2 (C-2'); 72,1 (C-3'); 62,3 (C-5'); 55,6 ( $CH_2$ ).

In analoger Weise wird, ausgehend von 2'-Desoxy-formycin A das entsprechende 2'-Desoxy-derivat hergestellt.

Beispiel 2:7-Chlor-3-(2'-desoxy-β-D-erythro-pentofuranosyl)-1H-pyrazolo-[4,3-d]pyrimidin

Die Verbindung wurde (wie von L. B. Townsend et al. in J. Chem. Soc. (C) 1971, 2443 für das Ribofuranosylderivat beschrieben), ausgehend von 2'-Desoxy-formycin B synthetisiert.

Letzteres wurde aus kommerziell erhältlichem Formycin B durch Barton-Deoxigenierung erhalten (Barton, D. H. R. & Motherwell, W. B. (1981) Pure Appl. Chem. 53, 15).

Beispiel 3:7-[1,6-Diaminohexyl]-3-(2'-desoxy-β-D-erythro-pentofuranosyl)-1H-pyrazolo-[4,3-d]pyrimidin

135 mg (0.5 mmol) Chlor-Nukleosid aus Beispiel 2 werden in 15 ml Ethanol gelöst, mit 300 mg (ca. 2.5 mmol) Hexamethylendiamin versetzt und 3 h zum Rückfluß erhitzt.

Im DC (Kieselgel; Chloroform-Methanol 80:20) beobachtet man die nahezu quantitative Umsetzung zum Titelprodukt. Die Reaktionsmischung wird mit 0.1 M HCl neutralisiert, eingedampft und das Konzentrat in 10 ml Ethanol gelöst. Nach Filtration von ungelösten Anteilen wird an einer Kieselgel 60 -Säule mit einem Gemisch Chloroform-Methanol (9:1) chromatographiert. Die vereinigten Fraktionen werden eingedampft und aus Dioxan lyophilisiert (85 mg = 48.5 % d. Th.)

Elementaranalyse für C<sub>16</sub>H<sub>26</sub>N<sub>6</sub>O<sub>3</sub> (350.2): Berechnet C 54.9, H 7.4, N 24.0; gefunden C 55.3, H 7.6, N 23.7.

Beispiel 4:7-[N-Trifluoracetamidohexyl]-amino-3-(2'-desoxy-β-D-erythro-pentofuranosyl)-1H-pyrazolo-[4,3-d]pyrimidin

80 mg (0.23 mmol) des Nukleosides aus Beispiel 3 werden in 10 ml wasserfreiem Pyridin gelöst und mit 150 µl (ca. 1 mmol) Trifluoressigsäureanhydrid versetzt. Nach 5 h Stehen bei Raumtemperatur ist die Acylierung laut DC vollständig. Die Reaktionslösung

sung wird danach im Vakuum eingedampft und dreimal mit Methanol coevaporiert. Man lyophilisiert aus Dioxan und erhält 100 mg (98 % d. Th.) des gewünschten Produktes.

Beispiel 5:

7-[N-Trifluoracetamidohexyl]-amino-3-(2'-desoxy-β-D-erythro-pentofuranosyl)-1H-pyrazolo-[4,3-d]pyrimidin-5'-triphosphat

50 mg (0,11 mmol) des geschützten Nukleosides aus Beispiel 4 werden nach der Methode von Yoshikawa et al. [Tetrahedron Lett. 50, 5065 (1967)] durch Phosphorylierung mit  $\text{POCl}_3$  in das 5'-Monophosphat überführt; daraus wird entsprechend dem Verfahren von Hoard & Ott

[J. Am. Chem. Soc. 87, (1965)] nach Aktivierung mit Carbonyldiimidazol und Umsetzung mit Pyrophosphorsäure nach Ionenaustausch-Chromatographie an DEAE-Sephadex das gewünschte Triphosphat in einer Ausbeute von 45 mg (59 %) erhalten.

$^{31}\text{P}$ -NMR (0,1 M EDTA/ $\text{D}_2\text{O}$ /Eth<sub>3</sub>N): -5,4 (d, P-gamma); -10,7 (d, P-alpha); -21,2 (t, P-β).

Beispiel 6:

Fluorescein-5(6)-carboxamidohexyl-[7-amino-3-(2'-desoxy-β-D-erythro-pentofuranosyl)-1H-pyrazolo-[4,3-d]pyrimidin-5'-triphosphat]

35 mg (0,05 mmol) der trifluoracetyl-geschützten Verbindung aus Beispiel 5 werden in 5 ml konz. Ammoniaklösung 1 h bei Raumtemperatur stehen gelassen und anschließend im Vakuum eingedampft. Der Rückstand wird in 5 ml 0,1 M Boratpuffer, pH 8,5 aufgenommen und mit einer Lösung von 31 mg (0,065 mmol) 5(6)-Carboxy-fluorescein-N-hydroxy-succinimidester in 5 ml aminfreiem Dimethylformamid versetzt. Man lässt über Nacht bei Raumtemperatur stehen. Das Reaktionsgemisch wird auf eine DEAE-Sephadex-Säule (30 x 1 cm) gegeben und mit einem linearen LiCl-Gradient (je 200 ml  $\text{H}_2\text{O}$  auf 0,4 M LiCl) eluiert. Man erhält nach Vereinigen der entsprechenden Fraktionen, Eindampfen, Fällung des Konzentrates in Aceton/Ethanol (2:1) und Trocknung 28 mg (59 %) der Titelsubstanz.

Spektrale Daten (0.1 M Phosphatpuffer, pH 9.0): Excitation<sub>max</sub> [nm]: 495:

Emission<sub>max</sub>: [nm]: 521

Entsprechend wurde durch Umsetzung des Nukleosides mit Digoxigenin-3-O-succinyl-aminocapronsäure-N-hydroxy-succinimidester das Digoxigenin-3-O-succinyl-E-aminocaproyl-[7-amino-3-(2'-desoxy-β-D-erythro-pentofuranosyl)-1H-pyrazolo-[4,3-d] pyrimidin-5'-triphosphat hergestellt.

Beispiel 7:

N<sup>1</sup>-(8-[N-tert.-Butoxycarbonyl]-amino-(3,6-dioxa)octyl-1-amidomethyl)-7-amino-3-(2'-desoxy-β-D-erythro-pentofuranosyl) pyrazolo-[4,3-d]pyrimidin

125 mg (0.5 mmol) 2'-Desoxy-formycin A, 369 mg (1 mmol) (N<sup>1</sup>-Bromacetamido-N<sup>8</sup>-t-butoxycarbonyl)-1,8-diamino-3,6-dioxa-octan, sowie 1.4 g K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> werden in 4 ml Methanol/H<sub>2</sub>O (1:1) 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Aufarbeitung geschah wie unter Beispiel 1 beschrieben. Nach Chromatographie an einer RP-18-Säule wurden 135 mg (50 %) der Titelverbindung erhalten.

Beispiel 8:

N<sup>1</sup>-(8-amino-(3,6-dioxa)octyl-1-amidomethyl)-7-amino-3-(2'-desoxy-β-D-erythro-pentofuranosyl) pyrazolo-[4,3-d]pyrimidin-5'-triphosphat

135 mg (0,25 mmol) des geschützten Nukleosides aus Beispiel 7 werden wie unter Beispiel 5 beschrieben in das Triphosphat überführt. Nach Chromatographie an RP-18 wird durch

1-stündige Behandlung mit Trifluoressigsäure die Boc-Schutzgruppe entfernt. Nach einer weiteren Chromatographie an QAE-Sephadex werden letztlich 25 mg der Titelverbindung erhalten.

<sup>31</sup>P-NMR (0.1 M EDTA/D<sub>2</sub>O/Eth<sub>3</sub>N): -6.4 (d, P-gamma); -11.1 (d, P-alpha); -21.6 (t, P-β).

Beispiel 9:Digoxigenin-3-O-succinyl-L-aminocaproyl-(N<sup>1</sup>-[8-Amino-(3,6-dioxa)octyl-1-amidomethyl]-7-amino-3-(2'-desoxy- $\beta$ -D-erythro-pentofuranosyl)pyrazolo-[4,3-d]pyrimidin-5'-triphosphat

17 mg (0.024 mmol) der Verbindung aus Beispiel 8 werden in 5 ml 0.1 M Boraatpuffer, pH 8.5 aufgenommen und mit einer Lösung von 25 mg (0.036 mmol) Digoxigenin-3-O-succinyl-aminocapronsäure-N-hydroxy-succinimidester in 5 ml aminfreiem Dimethylformamid versetzt. Man läßt 5 h bei Raumtemperatur röhren und chromatographiert anschließend an RP-18-Kieselgel. Nach Entsalzung und Lyophilisation werden 3 mg (ca. 10 %) des markierten Triphosphates erhalten.

Beispiel 10:4-Oxo-7-(2'-desoxy- $\beta$ -D-erythro-pentofuranosyl)-3H, 5H-pyrrolo-[3,2-d]pyrimidin

Die Verbindung wurde aus dem von M.-I. Lim et al. in Tetrahedron Lett. 1980, 21, 1013 beschriebenen Ribofuranosylderivat durch Barton-Deoxigenierung erhalten.

Beispiel 11:4-Chlor-7-(2'-desoxy- $\beta$ -D-erythro-pentofuranosyl)-3H, 5H-pyrrolo-[3,2-d]pyrimidin

Die Verbindung wurde nach dem von Townsend et al. in J. Chem. Soc. (C). 1971, 2443 beschriebenen Verfahren durch Halogenierung mit  $\text{POCl}_3$  synthetisiert.

Beispiel 12:4-[1,6-Diaminohexyl]-7-(2'-desoxy- $\beta$ -D-erythro-pentofuranosyl)-3H, 5H-pyrrolo-[3,2-d]pyrimidin

Das Derivat wurde, ausgehend von der chlorierten Verbindung aus Beispiel 11 durch Umsetzung mit Diaminohexan analog Beispiel 3. gewonnen.

Beispiel 13:Fluorescein-5(6)-carboxamidohexyl-[4-amino-7-(2'-desoxy- $\beta$ -D-erythro-pento-furanosyl)-3H, 5H-pyrrolo-[3,2-d]pyrimidin-5'-triphosphat]

Die Titelverbindung wurde aus dem Derivat aus Beispiel 12 über die Schritte Schutz der Diamino-Funktion mit Triflat, Herstellung des Triphosphates und Umsetzung mit Fluorescein-5(6)-carboxamido-N-hydroxy-succinimidester synthetisiert. Diese einzelnen Verfahrensschritte sind in den Beispielen 4, 5 und 6 beschrieben.

Beispiel 14:5-(2'-desoxy- $\beta$ -D-erythro-pento-furanosyl) pyrimidin-2,4-dion-5'-triphosphat

650 mg (2.85 mmol) 5-(2'-Desoxy- $\beta$ -D-erythro-pento-furanosyl)-pyrimidin-2,4-dion, hergestellt nach J. Org. Chem. 1982, 47, 485 durch Deoxygenierung des kommerziell erhältlichen 5-( $\beta$ -D-erythro-pento-furanosyl) pyrimidin-2,4-dion (Pseudouridin), werden nach der Methode von Ludwig [Acta Biochim. et Biophys. Acad. Sci. Hung. (1981), 16, 131] in einem Eintopf-Verfahren in das 5'-Triphosphat überführt. Anionenaustausch-Chromatographie an QAE-Sephadex mit einem LiCl-Gradient (Wasser auf 0.5 M) und Fällung in Aceton/Ethanol (2:1) und Trocknung ergeben 850 mg (60%) der Titelverbindung.

$^{31}P$ -NMR (0.1 M EDTA/D<sub>2</sub>O/Eth<sub>3</sub>N): -6.8 (d, P- $\gamma$ ); -11.0 (d, P- $\alpha$ ); -22.0 (t, P- $\beta$ ).

Beispiel 15:N<sup>1</sup>-[Ethoxypropionyl]-5-(2'-desoxy- $\beta$ -D-erythro-pento-furanosyl) pyrimidin-2,4-dion-5'-triphosphat

100 mg (0.2 mmol) des 2'-Desoxy-pseudouridin-5'-triphosphates aus Beispiel 14 werden in 5 ml 1 M Triethylammoniumbicarbonatpuffer (pH 8.9) gelöst und mit 5 ml Ethanol versetzt. Es werden 3 ml (ca. 30 mmol) Acrylsäureethylester zugefügt und die Mischung 6.5 h bei Raumtemperatur gerührt. Danach ist lt. DC (i-Buttersäure/konz. Ammoniak/Wasser = 66/1/33) kein Edukt mehr zu beobachten. Das Reaktionsgemisch wird i.V. eingedampft und je 1x mit einigen ml Ethanol und Wasser coevaporiert. Das rohe Produkt wird ohne weitere Reinigung wie unter Beispiel 16 angegeben, weiterverarbeitet.

Beispiel 16:N1-[1,3-Diaminopropyl]-5-(2'-desoxy-β-D-erythro-pentofuranosyl) pyrimidin-2,4-dion-5'-triphosphat

Das Produkt aus Beispiel 15 wird in 5 ml Wasser gelöst und mit 5 ml Ethanol, sowie 2 ml 1,3-Diaminpropan versetzt. Man röhrt über Nacht bei Raumtemperatur und engt dann an der Ölspülung i.V. bis zum viskosen Rückstand ein. Man nimmt in wenigen ml Wasser auf und stellt den pH mit verd. Essigsäure auf 6. Chromatographie/Entsalzung an RP 18 mit einem Triethylammoniumacetat/Acetonitril-Gradient lieferte 1000 A<sub>260</sub>-Einheiten (ca. 0.1 mmol) des rohen Gemisches der Verbindung, aus dem nach Ionenaustausch-Chromatographie an QAE-Sephadex mit LiCl 140 A<sub>260</sub>-Einheiten (ca. 20 μmol) der gewünschten Substanz isoliert wurden.

DC (i-Buttersäure/konz. Ammoniak/Wasser = 66/1/33): R<sub>f</sub> ca. 0.3: mit Ninhydrin positive Reaktion.

Beispiel 17:N1-Digoxigenin-3-O-methylcarbonyl-ε-aminocaproyl-1,3-diaminopropyl-propionyl]-5-(2'-desoxy-β-D-erythro-pentofuranosyl) pyrimidin-2,4-dion-5'-triphosphat

4.5 mg (5 μmol) des Diaminopropyl-Derivates aus Beispiel 16 werden in 1 ml 0.1 M Na-borat-Puffer, pH 8.5 gelöst und dazu 5 mg (7.5 μmol) Digoxigenin-3-O-methylcarbonyl-ε-amino-capronsäure-N-hydroxysuccinimidester, gelöst in 1 ml aminfreiem Dimethylformamid gegeben. Man lässt die klare Lösung ca. 3 h bei Raumtemperatur stehen. Die Reaktionslösung wird danach eingedampft, der Rückstand in 1 ml Wasser aufgenommen und mittels RP 18-Chromatographie gereinigt (Säule: Inertsil, 250 x 8 mm, Triethylammoniumacetat/Acetonitril). Nach Abziehen der flüchtigen Komponenten im Vakuum und Lyophilisation erhält man 7 mg (90%) der Titelverbindung.

Beispiel 18:Tetramethylrhodamin-5(6)-carboxamido-[N<sup>1</sup>-[8-N-[3,6-dioxa)octyl-1-amido-methyl]-5-(2'-desoxy-β-D-erythro-pentofuranosyl) pyrimidin-2,4-dion-5'-triphosphat]

Die Titelverbindung wurde durch Umsetzung von 18 mg (30 µmol) des Triphoshates aus Beispiel 16 und 17 mg (32 µmol) Tetramethylrhodamin-5(6)-carbonsäure-N-hydroxy-succinimidester in 0.1 M Na-boratpuffer, pH 8.5/DMF analog Beispiel 17 hergestellt und aufgereinigt. Es wurden 10.5 mg des TMR-markierten Nucleotids erhalten.

Spektrale Daten (0.1 M Na-boratpuffer, pH 8.5): Excitation<sub>max</sub> [nm]: 551;  
Emission<sub>max</sub> [nm]: 575

Beispiel 19:Nichtradioaktive DNA-Markierung und -Nachweis durch Einbau vonN<sup>1</sup>-Digoxigenin-3-O-methylcarbonyl-ε-aminocaproyl-1,3-diaminopropyl-propionyl]-5-(2'-desoxy-β-D-erythro-pentofuranosyl) pyrimidin-2,4-dion-5'-triphosphat]

Die DNA-Markierung und der DNA-Nachweis wurden mit dem kommerziell erhältlichen Kit der Firma Boehringer Mannheim (Best. Nr. 1093 657) durchgeführt. Die Arbeitsvorschrift gibt alle wesentlichen Arbeitsschritte wieder.

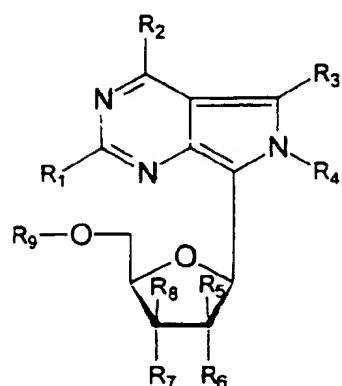
Zur Markierungsreaktion wurde das dNTP-Gemisch des Kits gegen ein solches mit N<sup>1</sup>-[Digoxigenin-3-O-methylcarbonyl-ε-aminocaproyl-1,3-diaminopropyl-propionyl]-5-(2'-desoxy-β-D-erythro-pentofuranosyl) pyrimidin-2,4-dion-5'-triphosphat aus Beispiel 17 (statt DIG-dUTP) ausgetauscht.

Die immunologische Nachweisreaktion ergab, daß der Einbau der erfindungsgemäßen Verbindung nach Beispiel 17 eine Nachweissensitivität der markierten DNA analog der Verwendung von DIG-dUTP zeigt.

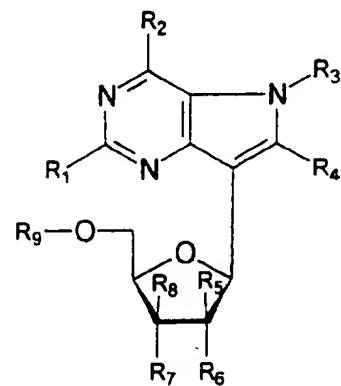
Das Ergebnis, den Nachweis und die erreichte Sensitivität des Systems demonstrierend. ist Abbildung 1 zu entnehmen.

## Patentansprüche

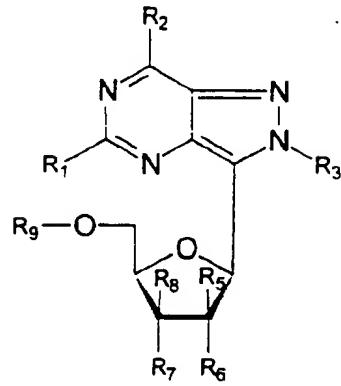
1. Pyrrolo-[3,2-*d*]pyrimidin-, Pyrazolo-[4,3-*d*]pyrimidin- und Pyrimidin-furanoside der allgemeinen Formeln I - V



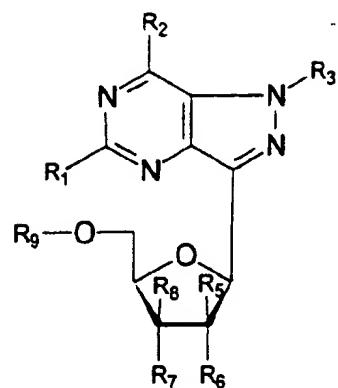
I



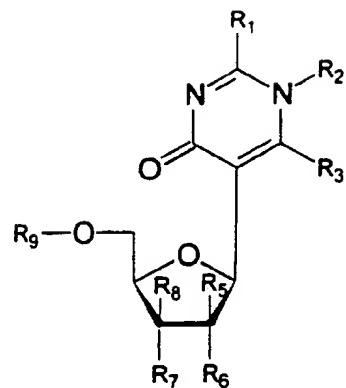
II



III



IV



V

in denen

R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, die gleich oder verschieden sein können. Wasserstoff, Halogen, Hydroxy, Thio- oder substituiertes Thio-, Amino- oder substituiertes Amino-, Carboxy-, Niederalkyl-, Niederalkenyl-, Niederalkinyl-, Aryl-, Niederalkyloxy-, Aryloxy-, Aralkyl-, Aralkyloxy-, oder eine Reportergruppe darstellen.

R<sub>5</sub> und R<sub>6</sub> jeweils Wasserstoff, Hydroxy, Thio- oder substituiertes Thio-, Amino- oder substituiertes Amino-, Niederalkyloxy-, Niederalkenoxy-, Niederalkinoxy-, eine Schutzgruppe oder eine Reportergruppe darstellen.

R<sub>7</sub> Wasserstoff, Hydroxy, Thio- oder substituiertes Thio-, Amino- oder substituiertes Amino-, eine Phosphoramidit- oder H-phosphonat-Funktion, einen in geeigneter Weise spaltbaren Ester- oder Amid-Rest oder eine Reportergruppe darstellt.

R<sub>6</sub> und R<sub>7</sub> zusammen eine weitere Bindung zwischen C-2' und C-3' oder eine Acetalfunktion bilden.

R<sub>8</sub> Wasserstoff oder eine Hydroxy-, Thio- oder substituierte Thio-, Amino- oder substituierte Amino-Gruppe darstellt.

R<sub>9</sub> Wasserstoff, eine Mono-, Di- oder Triphosphatgruppe, oder die alpha-, beta- oder gamma-Thiophosphatanalogen dieser Phosphorsäureester oder eine Schutzgruppe darstellt.

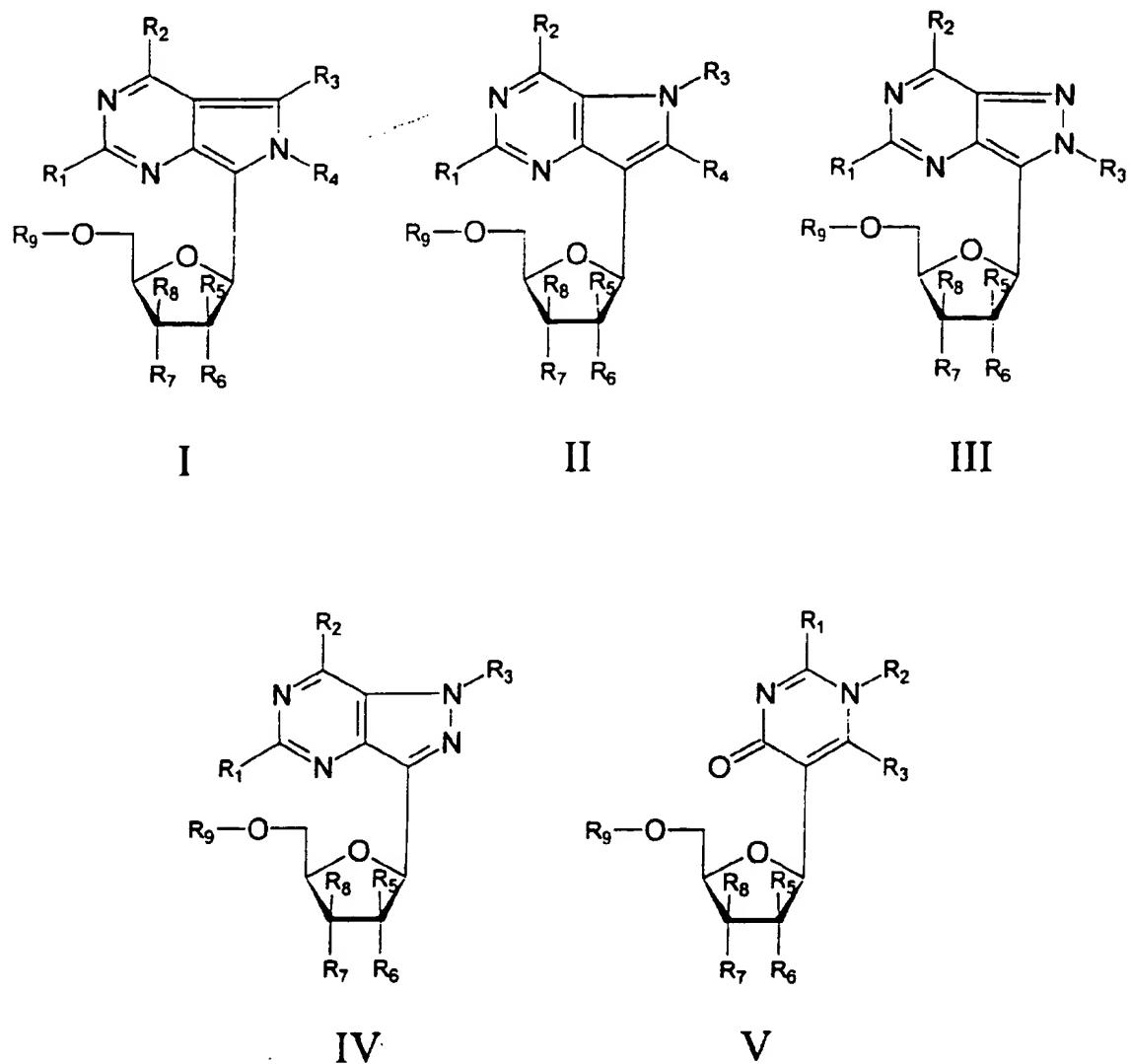
sowie mögliche Tautomere und Salze derselben.

2. Verbindungen nach Anspruch 1, in denen die Acetalfunktion mit einer Reportergruppe substituiert ist.
3. Verbindungen nach Anspruch 1 oder 2, in denen die Reportergruppe ein Hapten, Fluorophor, Metall-Chelat, Luminophor, Protein oder Interkalator bedeuten.
4. Verbindungen nach einem der Ansprüche 1 bis 3, in denen die Reportergruppe über eine Linkergruppe verknüpft ist.
5. Verwendung der Verbindungen nach einem der Ansprüche 1 bis 4 als Substrate für DNA- und RNA-Polymerasen.
6. Verwendung der Verbindungen nach den Ansprüchen 1 bis 4 zur Markierung von Nukleinsäuren.

7. Verwendung der Verbindungen nach den Ansprüchen 1 bis 4 zum Nachweis von Nukleinsäuren.
8. Verwendung der Verbindungen nach einem der Ansprüche 1 bis 4 in der DNA-Sequenzierung.
9. Verwendung der Verbindungen nach einem der Ansprüche 1 bis 4 in der *in situ* Hybridisierung.
10. Verwendung der Verbindungen nach Anspruch 1, in denen R<sub>7</sub> ein Phosphoramidit oder H-Phosphonat darstellt, zur chemischen Synthese von Oligonukleotiden.
11. Oligonukleotide, die eine oder mehrere der in den Ansprüchen 1 bis 4 genannten Verbindungen enthalten.
12. Nukleinsäuren, die eine oder mehrere der in den Ansprüchen 1 bis 4 genannten Verbindungen enthalten.

## Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft Pyrrolo-[3.2-*d*]pyrimidin-, Pyrazolo-[4.3-*d*]pyrimidin- und Pyrimidin-furanoside, d. h. sogenannte C-Nukleoside der allgemeinen Formeln I - V

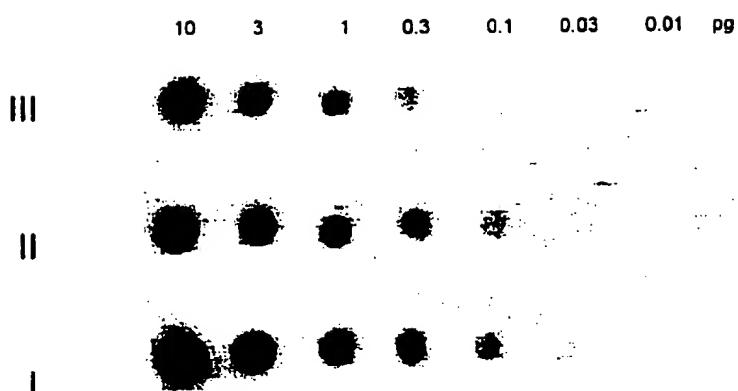


bzw. entsprechende Derivate sowie Verfahren zu deren Herstellung.

Die Verbindungen sind insbesondere als Substrate für RNA- bzw. DNA-Polymerasen geeignet und somit in RNA- bzw. DNA-Oligonukleotide einbaubar. Demzufolge sind

die Verbindungen insbesondere zur Markierung und zum Nachweis von Nukleinsäuren bzw. zur DNA-Sequenzierung geeignet.

Abb. 1



CSPD (Ch.02) / Bild vom 26.01.1995 / Film: 30 min

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int: xnal Application No  
PCT/EP 96/01051A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 6 C07H21/00 C12Q1/68 C07H19/04 C07D405/04 C07D487/04

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 6 C07H C12Q C07D

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	J. CHEM. SOC. PERKIN TRANS. 1, 1984, pages 2421-3, XP002008298 H. DAVIES ET AL.: "Conversion of Formycin into the Fluorescent Isoguanosine Analogue 7-Amino-3-(beta-D-Ribofuranosyl)-1H-pyrazo lo(4,3-d)pyrimidin-5(4H)-one" see the whole document ---	1
X	J. ORG. CHEM., vol. 53, 1988. pages 2777-82, XP002008299 C.K. CHU ET AL.: "Synthesis of C-Nucleoside Analogues" see the whole document ---	1 -/-



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"A" document member of the same patent family

1

Date of the actual completion of the international search

15 July 1996

Date of mailing of the international search report

06.08.96

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentdienst 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel: (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl  
Fax: (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Bardili, W

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP 96/01051

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	HELV. CHIM. ACTA, vol. 77, 1994, pages 481-501, XP002008300 W. PFLEIDERER ET AL.: "44. Nucleotides Part XLII" see the whole document ---	1-3, 10-12
P,X	NUCLEOSIDES, NUCLEOTIDES, vol. 15, 1996, pages 793-807, XP002008301 B.A. OTTER ET AL.: "Conformational Properties of Purine-like C-Nucleosides" see the whole document ---	1
X	BIOCHIMIE, vol. 77, 1995, pages 125-34, XP002008302 PF. AGRIS ET AL.: "Site-selected Introduction of modified purine and pyrimidine ribonucleosides into RNA by automated phosphoramidite chemistry" see the whole document ---	1,10-12
X	US,A,4 584 369 (KLEIN ROBERT S ET AL) 22 April 1986 see the whole document ---	1
X,Y	WO,A,93 16094 (CHROMAGEN INC) 19 August 1993 cited in the application see the whole document ---	1-12
X,Y	WO,A,95 05391 (CHROMAGEN INC) 23 February 1995 see the whole document ---	1-12
X	WO,A,94 11534 (UNIV JOHNS HOPKINS) 26 May 1994 see figure 4 ---	1,10-12
X	DATABASE PATENT ABSTRACTS OF JAPAN 1990 "Pseudouridine Derivative" XP002008303 see abstract & JP,A,02 196 787 (OTSUKA PHARMACEUT CO.) 3 August 1990 ---	1
X	DATABASE PATENT ABSTRACTS OF JAPAN 1989 "Pseudouridine Derivative" XP002008314 see abstract & JP,A,01 294 674 (OTSUKA PHARMACEUT. CO.) 28 November 1989 ---	1
1		-/-

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 96/01051

## C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	NUCLEIC ACIDS RES., vol. 20, 1992, pages 4831-7, XP002008312 K.J. LIVAK ET AL.: "Detection of single base differences using biotinylated nucleotides with very long linker arms" cited in the application see the whole document ---	1-12
Y	BIOL. CHEM. HOPPE-SEYLER, vol. 371, 1990, pages 953-65, XP002008313 E. HUBER ET AL.: "Non-radioactive Labeling and Detection of Nucleic Acids" cited in the application see the whole document -----	1-12

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.  
**PCT/EP 96/01051**

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2.  Claims Nos.: **1,5,10-12**  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:  
**A complete search covering claims 1,5 and 10-12 was not possible, as there is a very extensive literature on the claimed C nucleosides . Hence, documents were selected more or less arbitrarily and cited with regard to claims 1,5 and 10-12.**
  
3.  Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
  
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
  
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
  
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**  

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 96/01051

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
US-A-4584369	22-04-86	CA-A-	1224460	21-07-87
		DE-A-	3277623	17-12-87
		EP-A-	0071227	09-02-83
		JP-B-	4006715	06-02-92
		JP-A-	58026888	17-02-83
-----	-----	-----	-----	-----
WO-A-9316094	19-08-93	CA-A-	2129105	19-08-93
		EP-A-	0628051	14-12-94
		JP-T-	7504087	11-05-95
-----	-----	-----	-----	-----
WO-A-9505391	23-02-95	CA-A-	2145750	23-02-95
		EP-A-	0669928	06-09-95
-----	-----	-----	-----	-----
WO-A-9411534	26-05-94	AU-B-	5611794	08-06-94
		EP-A-	0672190	20-09-95
		JP-T-	8503369	16-04-96
-----	-----	-----	-----	-----

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 96/01051

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
 IPK 6 C07H21/00 C12Q1/68 C07H19/04 C07D405/04 C07D487/04

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprästoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C07H C12Q C07D

Recherchierte aber nicht zum Mindestprästoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	J. CHEM. SOC. PERKIN TRANS. 1, 1984, Seiten 2421-3, XP002008298 H. DAVIES ET AL.: "Conversion of Formycin into the Fluorescent Isoguanosine Analogue 7-Amino-3-(beta-D-Ribofuranosyl)-1H-pyrazo lo(4,3-d)pyrimidin-5(4H)-one" siehe das ganze Dokument ---	1
X	J. ORG. CHEM., Bd. 53, 1988, Seiten 2777-82, XP002008299 C.K. CHU ET AL.: "Synthesis of C-Nucleoside Analogues" siehe das ganze Dokument ---	1 -/-

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

\*'A' Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

\*'E' älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmelde datum veröffentlicht worden ist

\*'L' Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

\*'O' Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

\*'P' Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmelde datum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*'T' Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmelde datum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*'X' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfunderner Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*'Y' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfunderner Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*'Z' Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

1

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

15.Juli 1996

Anmelde datum des internationalen Recherchenberichts

06.08.96

Name und Postanschrift der internationale Recherchenbehörde  
 Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patenttaan 2  
 NL - 2280 HV Rijswijk  
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
 Fax (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Bardili, W

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 96/01051

## C(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	HELV. CHIM. ACTA, Bd. 77, 1994, Seiten 481-501, XP002008300 W. PFLEIDERER ET AL.: "44. Nucleotides Part XLII" siehe das ganze Dokument ---	1-3, 10-12
P,X	NUCLEOSIDES, NUCLEOTIDES, Bd. 15, 1996, Seiten 793-807, XP002008301 B.A. OTTER ET AL.: "Conformational Properties of Purine-like C-Nucleosides" siehe das ganze Dokument ---	1
X	BIOCHIMIE, Bd. 77, 1995, Seiten 125-34, XP002008302 PF. AGRIS ET AL.: "Site-selected Introduction of modified purine and pyrimidine ribonucleosides into RNA by automated phosphoramidite chemistry" siehe das ganze Dokument ---	1,10-12
X	US,A,4 584 369 (KLEIN ROBERT S ET AL) 22.April 1986 siehe das ganze Dokument ---	1
X,Y	WO,A,93 16094 (CHROMAGEN INC) 19.August 1993 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	1-12
X,Y	WO,A,95 05391 (CHROMAGEN INC) 23.Februar 1995 siehe das ganze Dokument ---	1-12
X	WO,A,94 11534 (UNIV JOHNS HOPKINS) 26.Mai 1994 siehe Abbildung 4 ---	1,10-12
X	DATABASE PATENT ABSTRACTS OF JAPAN 1990 "Pseudouridine Derivative" XP002008303 siehe Zusammenfassung & JP,A,02 196 787 (OTSUKA PHARMACEUT CO.) 3.August 1990 ---	1
X	DATABASE PATENT ABSTRACTS OF JAPAN 1989 "Pseudouridine Derivative" XP002008314 siehe Zusammenfassung & JP,A,01 294 674 (OTSUKA PHARMACEUT. CO.) 28.November 1989 ---	1
1		-/-

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 96/01051

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	NUCLEIC ACIDS RES., Bd. 20, 1992, Seiten 4831-7, XP002008312 K.J. LIVAK ET AL.: "Detection of single base differences using biotinylated nucleotides with very long linker arms" in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	1-12
Y	BIOL. CHEM. HOPPE-SEYLER, Bd. 371, 1990, Seiten 953-65, XP002008313 E. HUBER ET AL.: "Non-radioactive Labeling and Detection of Nucleic Acids" in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument -----	1-12

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

internationales Aktenzeichen

PCT/EP 96/01051

## Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt I auf Blatt I)

Gemäß Artikel 17(2a) wurde aus folgenden Gründen für besondere Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1.  Ansprüche Nr. \_\_\_\_\_, weil Sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich \_\_\_\_\_
2.  Ansprüche Nr. 1,5,10-12, weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich  
Eine vollständige Recherche im Umfang der Ansprüche 1,5 und 10-12 war nicht möglich, da es ein sehr umfangreiches Schrifttum zu den beanspruchten C-Nukleosiden gibt. Es wurde daher eine mehr oder weniger willkürliche Auswahl an Dokumenten getroffen und zu den Ansprüchen 1,5 und 10-12 genannt.
3.  Ansprüche Nr. \_\_\_\_\_, weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgeführt sind.

## Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt I)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1.  Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche der internationalen Anmeldung.
2.  Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die internationale Recherchenbehörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3.  Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche der internationalen Anmeldung, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr. \_\_\_\_\_.
4.  Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.  
 Die Zahlung zusätzlicher Gebühren erfolgte ohne Widerspruch.

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Int. nationales Aktenzeichen

PCT/EP 96/01051

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
US-A-4584369	22-04-86	CA-A-	1224460	21-07-87
		DE-A-	3277623	17-12-87
		EP-A-	0071227	09-02-83
		JP-B-	4006715	06-02-92
		JP-A-	58026888	17-02-83
-----	-----	-----	-----	-----
WO-A-9316094	19-08-93	CA-A-	2129105	19-08-93
		EP-A-	0628051	14-12-94
		JP-T-	7504087	11-05-95
-----	-----	-----	-----	-----
WO-A-9505391	23-02-95	CA-A-	2145750	23-02-95
		EP-A-	0669928	06-09-95
-----	-----	-----	-----	-----
WO-A-9411534	26-05-94	AU-B-	5611794	08-06-94
		EP-A-	0672190	20-09-95
		JP-T-	8503369	16-04-96
-----	-----	-----	-----	-----